

(19)



JAPANESE PATENT OFFICE

PATENT ABSTRACTS OF JAPAN

(11) Publication number: **06125769 A**

(43) Date of publication of application: **10.05.94**

(51) Int. Cl

C12N 1/16
C12Q 1/02
//(C12N 1/16 , C12R 1:865), (C12Q
1/02 , C12R 1:865)

(21) Application number: **04158497**

(22) Date of filing: **07.05.92**

(30) Priority: **07.05.91 US 91 696661**
22.05.91 US 91 703970
22.05.91 US 91 703967
22.05.91 US 91 703964
28.04.92 US 92 875170

(71) Applicant: **MERCK & CO INC**

(72) Inventor: **PARENT STEPHEN A**
BRIZUELA LEONARDO E
CHREBET GARY L
BOSTIAN KEITH A

(54) **NEW YEAST MUTANT**

(57) Abstract:

PURPOSE: To provide a yeast mutant useful for assaying FK-506 type immunosuppressive activity, to provide a method for obtaining the same, and to provide a method for using the same.

CONSTITUTION: This *Saccharomyces cerevisiae* mutant

is deposited as American Type Culture Collection(ATCC) No. 74055, 74061 and the like, and has either of *fkrl*, *fkrl2* and *fkrl3* mutant genes or their mixture. The mutant is sensitive to rapamycin, resistant to FK-506, proliferates in a proliferation culture medium at 30°C and does not proliferate in the absence of FK-6 at 37°C.

COPYRIGHT: (C)1994,JPO

(19)日本国特許庁 (J P)

(12) 公 開 特 許 公 報 (A)

(11)特許出願公開番号

特開平6-125769

(43)公開日 平成 6 年(1994) 5 月10日

(51)Int.Cl. ⁵	識別記号	庁内整理番号	F I	技術表示箇所
C 1 2 N 1/16	G	7236-4B		
C 1 2 Q 1/02		6807-4B		
// (C 1 2 N 1/16				
C 1 2 R 1:865)				
(C 1 2 Q 1/02				

審査請求 有 請求項の数10(全 25 頁) 最終頁に続く

(21)出願番号	特願平4-158497	(71)出願人	390023526 メルク エンド カムパニー インコーポ レーテッド MERCK & COMPANY INC OPORATED アメリカ合衆国、ニュージャージー、ロー ウエイ、イースト リンカーン アヴェニ ュー 126
(22)出願日	平成 4 年(1992) 5 月 7 日	(72)発明者	ステフエン エー. バレント アメリカ合衆国、08512 ニュージャージ ィ、クランバリー、ウッド ミル ドライ ヴ 324
(31)優先権主張番号	6 9 6 6 6 1	(74)代理人	弁理士 岡部 正夫 (外 5 名) 最終頁に続く
(32)優先日	1991年 5 月 7 日		
(33)優先権主張国	米国 (U S)		
(31)優先権主張番号	7 0 3 9 7 0		
(32)優先日	1991年 5 月22日		
(33)優先権主張国	米国 (U S)		
(31)優先権主張番号	7 0 3 9 6 7		
(32)優先日	1991年 5 月22日		
(33)優先権主張国	米国 (U S)		

(54)【発明の名称】 新規酵母変異株

(57)【要約】

【目的】 F K - 5 0 6 型免疫抑制活性をアッセイするの
に有用な酵母変異株、その取得方法および使用方法を提
供する。

【構成】 f k r 1、f k r 2、f k r 3 変異遺伝子のい
ずれかまたはその混合を有するサッカロミセス・セレビ
シエの変異株は、ラバマイシンに感受性で F K - 5 0 6
に耐性である。

【特許請求の範囲】

【請求項1】 f k r 3変異遺伝子を含有するサッカロミセスセレビシエ変異株の生物学的に純粋な形態であって、該変異株が増殖培地中30℃で増殖を示し、FK-506の不存在下では37℃で増殖を示さないことを特徴とする。

【請求項2】 YFK093 (MY2088) として同定され、ATCC74055である生物学的に純粋な形態のサッカロミセスセレビシエ変異株。

【請求項3】 (a) 検定する化合物またはブロスを37℃で f k r 3変異遺伝子を含有するサッカロミセスセレビシエと接触させ、(b) FK-506免疫抑制型活性の存在下で増殖できる該変異株の増殖特徴を観察する工程からなる、FK-506免疫抑制型活性について化合物あるいは発酵ブロスを試験する方法。

【請求項4】 f k r 2変異遺伝子を含有するサッカロミセスセレビシエ変異株の生物学的に純粋な形態であって、該変異株がFK-506を含有する増殖培地中30℃で増殖特性を示し、ラバマイシンの存在下では増殖を示さないことを特徴とする。

【請求項5】 YFK014 (メルクカルチャーコレクションMY2097) ATCC74062、及びYFK-023-17A (メルクカルチャーコレクションMY2098) ATCC74063として同定された生物学的に純粋な形態のサッカロミセスセレビシエ f k r 2変異株。

【請求項6】 f k r 1変異遺伝子を含有するサッカロミセスセレビシエ変異株の生物学的に純粋な形態であって、該変異株がFK-506を含有する増殖培地中30℃で増殖を示し、ラバマイシンの存在下では増殖を示さないことを特徴とする。

【請求項7】 変異株YFK012 (ATCC74061)、YFK045、YFK054、YFK021-5C、YFK059-Bから選択される請求項6記載のサッカロミセス f k r 1変異株。

【請求項8】 (a) 化合物またはブロスを f k r 1、f k r 2、f k r 3変異遺伝子あるいはこれらの混合変異を含有するサッカロミセスセレビシエ変異株と接触させ、(b) FK-506免疫抑制型活性の存在下で陽性である該変異株の増殖特性を観察する工程からなるラバマイシン不存在下でのFK-506免疫抑制型活性について化合物あるいは発酵ブロスを試験する方法。

【請求項9】 サッカロミセス f k r 3変異株がMY2088、であるATCC74055であり、サッカロミセス f k r 2変異株がMY2097、であるATCC74062であり、サッカロミセス f k r 2変異株がMY2098、であるATCC74063であり、サッカロミセス f k r 1変異株がMY2096、であるATCC74061である請求項8記載の方法。

【請求項10】 該サッカロミセスが、ATCC740

55から由来する、f k r 3変異遺伝子を含有する f k r 3変異体あるいは株、MY2096、であるATCC74061から由来する、f k r 1変異遺伝子を含有する f k r 1変異体あるいは株、YFK014 (MY2097) であるATCC74062あるいはYFK-023-17A (MY2098) であるATCC74063から由来する、f k r 2変異遺伝子を含有する f k r 2変異体あるいは株である請求項8記載の方法。

【発明の詳細な説明】

【0001】本発明は、活性のあるFK-506型免疫抑制剤を検定するための新規酵母変異株を用いた新しい方法である。具体的には f k r 3変異を有する新規酵母変異株サッカロミセス・セレビシエYFK093 (メルク菌株コレクション No.MY2088) ATCC No.74055、f k r 1変異遺伝子を有するS. セレビシエYFK012 (メルク菌株コレクション No.MY2096) ATCC No.74061、f k r 2変異を有するS. セレビシエYFK014 (メルク菌株コレクション No.MY2097) ATCC No.74062とYFK-023-17A (メルク菌株コレクションMY2098) ATCC No.74063を開示するものである。

【0002】1983年に米国FDAはシクロスポリンを認可したが、これは非常に強力な拒絶反応抑制剤であって臓器移植手術の分野を一変させた。この薬剤は体の免疫システムが莫大な本来備わる保護手段を動員して外来蛋白質の移植を拒絶するのを抑制する。薬剤は移植拒絶を抑えるに効果が高いが、腎臓障害、肝臓へのダメージ、潰瘍などの多くのケースで極めて重症になる可能性のある障害をおこす欠点がある。ここに引用して組み込むEPO公開 No.0184162 (藤沢) (現在米国特許4,894,366号として発行) においては、新規マクロライド免疫抑制剤FK-506を開示するが、これはシクロスポリンよりも100倍以上効果が強いといわれている。このマクロライドは、ストレプトミセス・ツクバエンシスの特定の株により発酵生産される。また、ストレプトミセス・ヒグロスコピクス subsp. ヤクマエンシスにより生産される極めて類縁のマクロライド免疫抑制剤FK-520 (FK-900520) も開示されている。新規なFK-506タイプ免疫抑制剤アナログの合成にあたり、アゴニストであるFK-506のアナログとラバマイシンなどのアンタゴニストである免疫抑制剤とを分けるための、実験動物のいらない簡単で便利なアッセイがあると役に立つであろう。さらに発酵ブロス中にラバマイシンなどの他の免疫抑制剤とは反対のFK-506タイプの免疫抑制活性が存在することを確認するための簡単で便利なアッセイがあると役に立つであろう。シクロスポリンに耐性で、シクロフィリン結合活性を欠く、サッカロミセス・セレビシエの他の菌株およびニューロスボラ・クラッサがネーチャー (342巻、953-955頁) に報告されている。しかしなが

ら、FK-506耐性で37℃で生育依存を示すS. セレビスエの変異株は今のところ文献に報告はない。

【0003】要約するに本発明は、fkr3変異を有する新規なサッカロミセス・セレビスエの変異株の純粋培養物を提供するものである。なかでもS. セレビスエYFK093 (MY2088) ATCC No.74055は、30℃では培養できるが、37℃で培養するにはFK-506あるいはFK-900520を要求するものである。本変異株および他の変異株を取得する方法もまた提供するものである。また以下の方法からなる、FK-506型免疫抑制活性について、化合物あるいは発酵

1) 試験する化合物またはプロスをfkr3変異を有するサッカロミセス・セレビスエ変異株と37℃で接触させる。

2) 生育の特徴を観察する—この菌はFK-506型免疫抑制活性が存在すると生育できる。

さらに、fkr2変異を有するサッカロミセス・セレビスエ変異株の純粋培養物を提供するものである。この変異株は30℃でFK-506を含む生育培地では生育できるが、ラバマイシンが存在したのでは生育できない。さらに、新規な酵母変異株であるサッカロミセス・セレビスエYFK014 (MY2097) ATCC No.74062、およびS. セレビスエYFK-023-17A (MY2098) ATCC No.74063の純粋培養物を提供するものである。これらはFK-506またはFK-900520には耐性であるが、ラバマイシン感受性である。これらの変異株および他のfkr2変異株を取得する方法も同時に提供するものである。さらにfkr1変異を有するサッカロミセス・セレビスエ変異株の純粋培養物を提供するものである。この変異株は30℃ではFK-506を含む培地で生育が観察されるがラバマイシンの存在下では生育できない。さらに新規酵母変異株であるサッカロミセス・セレビスエYFK012 (MY2096) ATCC No.74061の純粋培養を提供するものである。この変異株はfkr1変異を有しラバマイシンには感受性であるが、FK-506またはFK-900520には耐性である。これらの変異株および他のfkr1変異株を取得する方法も同時に提供するものである。さらに、fkr1、fkr2、またはfkr3変異の1つを含むサッカロミセス・セレビスエ変異株またはその混合変異株をFK-506存在下で培養することからなる、FK-506またはFK-506型免疫抑制剤を同定する方法を提供するものである。これらの変異株は20-35℃、好ましくは30℃ではFK-506の存在下で生育するが、ラバマイシンの存在下では生育しない。これらの親株はFK-506またはラバマイシンのどちらが存在しても生育できない。

【0004】以下本発明を詳細に説明する。本発明は異なるサッカロミセス・セレビスエ（以下酵母）変異株を

培養することを含む。これら微生物は現在アメリカンタイプカルチャコレクション（米国メリーランド州、ロックビル、パークローンドライブ12301）にここに示すATCC番号で寄託してある。各微生物の生物学的特徴を以下簡単に説明する。推奨される保存方法は凍結状態で-80℃で保存することである。試験を行なうには28℃でYPAD培地（イーストエキス10g、バクトペプトン20g、デキストロース20g、アデニン60mg/L）で維持する。以下の文章中、かっこ内の数字は明細書の後ろの「参考文献」中の引用文献を示すものである。

【0005】以下のデータに基づき、これら微生物は酵母のサッカロミセス属の一員であると同定された。以下は酵母の変異株YFK093 ATCC No.74055 (fkr3) の一般的説明である。YFK093—生育の観察、一般的培養特性、炭素源資化性は Shirling と Gottlieb (Internat. J. System, Bacteriol. 16: 313-340) の方法に従って行なった。培養の色は色標準表（学会色委員会—米国立標準局セントロイドカラーチャート、米国商業省、国立標準局NBS回状に対する補遺 553、1985年）と比較して決定した。サッカロミセス・セレビスエYFK093 (MY2088)

27℃でイーストマルツエキス寒天培地、サブローマルトース寒天培地、トリブチケースソイ寒天培地上で生育する。サブローデキストロース寒天培地上では27℃と37℃で生育する（注：37℃では寒天上に菌を濃く画線すれば生育が認められるが、軽く画線したのでは生育は認められない）。培養は72時間で成熟する。コロニーは白からクリーム色で、滑らか、全縁、バター状で香がよい。細胞は球状、亜球状から卵形で直径4.5-7μmである。偽菌糸の発達は認められない。再生産は多層の出芽と、卵状の子嚢胞子（9-12×8.5-11μm）による。栄養細胞はグラム陽性であるが、子嚢胞子はグラム陰性である。種々の炭素を資化する能力を決定するため、API 20C臨床酵母システムを用いて特性付けを行なった。この菌株が生育にアデニン、ロイシン、リシン、トリプトファンおよびウラシルを要求するため、結果は出なかった。

【0006】以下はサッカロミセス・セレビスエYFK005 (MY2094) ATCC No.74059の一般的説明である。この株はfkr1とfkr2変異株の親株である。YFK005—生育の観察、一般的培養特性、炭素源資化性は Shirling と Gottlieb (Internat. J. System, Bacteriol. 16: 313-340) の方法に従って行なった。培養の色は色標準表（学会色委員会—米国立標準局セントロイドカラーチャート、米国商業省、国立標準局NBS回状に対する補遺 553、1985年）と比較して決定した。

サッカロミセス・セレビスエYFK005, MY209